

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA BASILICATA
POTENZA



FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN
BIOTECNOLOGIE VEGETALI

Esame di BIOTECNOLOGIE VEGETALI
DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO - Prof. Giuseppe Martelli

FOTOMORFOGENESI, EFFETTO DEI FITOORMONI E
REGOLAZIONE GENICA DURANTE IL CICLO VITALE
DELLE PIANTE

Adriano Sofo (matricola 26403)

Indice

Introduzione.....	3
Influenza della luce sullo sviluppo delle piante.....	3
Il sistema del fitocromo	3
Il sistema dei recettori per la luce blu.....	5
L'orologio biologico.....	6
I fitoormoni.....	7
I fitoormoni e la luce come regolatori dello sviluppo.....	9
<i>Lo sviluppo del seme nelle angiosperme.....</i>	9
<i>Le molecole regolatrici degli stadi di sviluppo tardivi del seme.....</i>	10
<i>Il ruolo dell'acido abscissico.....</i>	10
<i>La germinazione.....</i>	11
<i>Gli stadi di sviluppo precoci del seme.....</i>	12

Introduzione

Lo sviluppo di una pianta è un processo influenzato da fattori interni, come ad esempio l'orologio biologico endogeno e l'espressione genica, e da fattori esogeni, tra cui i più importanti sono la luce e la temperatura. Gli stimoli ambientali, agendo come modulatori, influenzano lo sviluppo più da un punto di vista quantitativo che qualitativo. La luce, insieme alla temperatura, è sicuramente il fattore ambientale più importante ed è percepita dalle piante mediante specifici fotorecettori. Affinché la pianta risponda allo stimolo, il segnale deve però essere trasmesso a livello delle singole cellule. Alla trasduzione del segnale sono quindi deputate le cosiddette "molecole segnale", quali i fitormoni e i messaggeri intracellulari.

Influenza della luce sullo sviluppo delle piante

Le piante mostrano risposte fisiologiche a lunghezze d'onda da 280 a 800 nm, regione dello spettro che comprende la luce visibile ma anche le regioni UV-A e UV-B e l'infrarosso vicino. La luce influisce sulla risposta fotosintetica e lo sviluppo di una pianta per tutto il suo ciclo. Per rispondere agli stimoli luminosi, le piante devono rilevare e analizzare l'intensità e la lunghezza d'onda della luce incidente per mezzo di fotorecettori con differenti spettri d'azione. Dal momento che il fotorecettore non interagisce direttamente sul DNA cellulare, è necessaria inoltre una catena di trasduzione del segnale tra i due.

Nelle piante sono presenti almeno tre tipi di fotorecettori: fitocromo, luce blu/UV-A e UV-B. Le clorofille e i carotenoidi, che sono i pigmenti più abbondanti, non sono utilizzati come sensori per la luce. Da un punto di vista biomolecolare, uno dei sistemi-modello più studiati per comprendere l'effetto della luce sulle piante è costituito dalle piantine eziolate, le quali presentano un insieme di caratteristiche (lunghi internodi, foglie piccole e rudimentali, colore giallo per scarso sviluppo dei cloroplasti e mancata sintesi di clorofilla). Le piante eziolate sono un sistema ideale in quanto modificano la loro crescita molto velocemente quando sono poste alla luce. Le variazioni che sono regolate dalla luce sono chiamate fotomorfogeniche, mentre quelle che avvengono al buio sono dette scotomorfogeniche.

Il sistema del fitocromo

Il sistema del fitocromo è probabilmente il più studiato tra i fotorecettori vegetali. I fitocromi hanno due stati possibili, in equilibrio foto-dinamico, che differiscono dai loro massimi

di assorbanza (660 e 730 nm) e possono convertirsi da uno stato ad un altro a seconda della lunghezza d'onda della luce assorbita (ad es. la luce a 660 nm convertirà la forma $P_R 660nm$ nella forma $P_{FR 730nm}$ e viceversa). I fitocromi sono cromoproteine composte da un'apoproteina di circa 120 kDa e un cromoforo lineare tetrapirrolico legato covalentemente. La forma $P_{FR 730nm}$ è considerata la forma attiva in quanto molti processi fotomorfofenici sono indotti dalla luce rossa. Il fitocromo agisce quindi come "interruttore molecolare" presente in due stati, che induce la pianta a intraprendere o meno una determinata via di sviluppo piuttosto che un'altra. Infatti, le reazioni che dipendono dal fitocromo sono state classificate, in termini di flusso fotonico e di tempo di irraggiamento, in due categorie: reazioni di induzione (IR) e reazioni da alto irraggiamento (HIR). Le IR sono a loro volta divise in reazioni a flusso basso (LFR) e reazioni a flusso molto basso (VLFR). Una reazione LFR è la classica risposta dipendente dal fitocromo, caratterizzata da foto-reversibilità. Le LFR richiedono un flusso fotonico di almeno 1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ di luce rossa (2% di fitocromo sotto forma di $P_{FR 730nm}$) mentre le VLFR meno di 0.1 nmol/m^2 di luce rossa (0.01% di $P_{FR 730nm}$). Le reazioni HIR mostrano un picco di risposta nel far-red e nella regione del blu; esse dipendono dal flusso di energia e sono irreversibili. In natura è molto difficile dividere gli effetti di queste reazioni in quanto agiscono in concerto, regolando molti processi differenti. A prova di ciò, l'induzione della germinazione del seme in *Arabidopsis* sembra essere una reazione LFR foto-reversibile, ma ad uno sguardo più attento la germinazione è indotta anche da una VLFR.

I fitocromi hanno la capacità di accendere e spegnere alcuni geni. Già dal 1979, infatti, sono riportati in letteratura esempi dell'accumulo intracellulare di specifici mRNA dopo esposizione a luce rossa (660 nm), ma oggi questi esempi sono tantissimi. Il sistema del fitocromo induce la trascrizione di mRNA correlati con i complessi fotosintetici, con il metabolismo della antocianine (calcone sintasi) e con l'assimilazione dell'azoto (nitrato e nitrito reductasi). La regolazione avviene a livello di trascrizione, come evidenziato da esperimenti di *run-on transcription* usando ribonucleotidi trifosfati radio-marcati. Il fitocromo può anche spegnere alcuni geni, come nel caso della *down-regulation* della trascrizione dell'mRNA per la protochlorofillide ossidoreduttasi A quello per il fitocromo A stesso.

La regolazione genica ad opera del fitocromo non è ancora completamente chiarita ma esperimenti di delezione in promotori regolati dalla luce hanno permesso di individuare elementi regolatori in *cis* in questi promotori. Molti di questi *cis*-regolatori presentano il motivo GTGTGGTTAATATG, chiamato anche BOX II, il quale lega il fattore di trascrizione GT-1. Se questi motivi sono inseriti in promotori non regolati dalla luce, meglio se fusi con le TATA box, i promotori diventano inducibili dalla luce. Ancora non si sa se esistono altri elementi regolatori

e se la pianta utilizza differenti motivi e fattori di trascrizione per ogni fotorecettore. Importante sarebbe anche individuare motivi di sequenze che rafforzano la risposta (*enhancer*) ma che di per sé non la inducono.

Nelle piante esistono due differenti *pool* di fitocromi. Nelle piante eziolate c'è il fitocromo I, che diminuisce rapidamente quando la pianta è esposta alla luce, e il fitocromo II, la cui quantità non è influenzata dalla luce. Esistono inoltre differenti geni che codificano per queste famiglie di fitocromi. In *Arabidopsis*, sono stati isolate le famiglie geniche *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* e *PHYE*. I geni *PHYA* codificano per il fitocromo di tipo I e la sua trascrizione è bloccata dalla luce. I geni *PHYB* codificano per il fitocromo di tipo II e, come per *PHYC*, il loro mRNA non è influenzato dalla luce. Le informazioni su questi fitocromi sono state ottenute mediante l'utilizzo di mutanti *hy*, i quali presentano un fenotipo eziolato, con un ipocotile allungato, anche se crescono alla luce e i mutanti *DET/COP*, che mostrano alcune caratteristiche dei fenotipi piantine illuminate, anche se cresciuti al buio (soppressione della fotomorfogenesi al buio). Gli esperimenti con questi mutanti hanno dimostrato che il fitocromo A è coinvolto nelle risposte HIR ed è fondamentale per la germinazione del seme e per i primi stadi di sviluppo, mentre il fitocromo B è il fotorecettore delle reazioni VLFR ed è coinvolto soprattutto nello sviluppo e nella crescita della pianta adulta.

I meccanismi di trasduzione dei segnali percepiti mediante il fitocromo sono rappresentati da proteine G, fosfatidilinositolo fosfato, Ca^{2+} /calmodulina e proteine chinasi a diverse specificità. La ricerca della cascata di segnali intracellulari attivati in seguito ad uno stimolo luminoso è stata favorita dallo studio di mutanti *aurea* di pomodoro, i quali presentano solo il 5% del normale contenuto di fitocromo A. Sembra che la molecola fondamentale che segue il fitocromo A nella cascata di eventi sia una proteina G eterodimerica. Successivamente il segnale si divide in due percorsi: uno dipendente da una Ca^{2+} /calmodulina porta all'attivazione dei promotori CAB (chlorophyll-*a/b*-binding protein); l'altro, mediato dal cGMP, trasmette il segnale al promotore CHS (calcone sintasi); entrambi attivano il promotore FNR (NADP⁺-ferredossina ossidoriduttasi).

Il sistema dei recettori per la luce blu

La luce blu determina effetti significativi sulla morfogenesi delle piante. Il fototropismo, la chiusura stomatica, lo sviluppo dei protalli delle alghe, la somatogenesi a partire dai calli e lo sviluppo fiorale sono tutti processi che dipendono dalla luce blu. La capacità delle piante di percepire la luce blu e l'UV è stata acquisita probabilmente moltissimo tempo fa, quando la

radiazioni UV sulla Terra era molto più alta di quella attuale e le piante dovevano possedere sistemi di protezione contro queste radiazioni così energetiche e ionizzanti.

Esistono diversi tipi di recettori per la luce blu (chiamati anche criptocromi) che agiscono in parallelo, anche se in modo indipendente, ma pochi di essi sono stati individuati e caratterizzati. CRY1 è un criptocromo che presenta similarità con le fotoliasi microbiche e la tropomiosina presente nei muscoli. Le fotoliasi sono enzimi che riparano il DNA e in particolare dividono i dimeri di timina prodotti in seguito ad esposizione UV e trasferiscono gli elettroni al FAD. CRY1 è una proteina citoplasmatica solubile e presente in tutti i tessuti vegetali. Altri due criptocromi isolati sono CRY2 e NPH1. Quest'ultima è una chinasi con un dominio sensibile allo stato redox intracellulare.

La luce blu è in grado di attivare alcuni geni, tra cui quelli delle proteine degli apparati fotosintetici, del metabolismo dei flavonoidi e del trasporto di acqua attraverso il plasmalemma. Molti di questi geni sono attivati non solo dalla luce blu, ma anche da UV e luce rossa.

L'orologio biologico

Il termine "ritmo circadiano" può essere usato per descrivere alcuni processi vitali, quali il movimento delle foglie, che ha un periodo di 1 giorno, e che mantengono il loro ritmo anche se le condizioni ambientali rimangono costanti. L'orologio endogeno ha un periodo di 24 ± 3 ore (da cui il termine "circadiano") ma è necessario uno stimolo esterno per avviarlo. Nelle piante, lo stimolo più importante è la luce. Questo assicura che le risposte che dipendono dal ritmo circadiano dell'orologio biologico avvengano in ore specifiche della giornata e che il ritmo interno della pianta sia sincronizzato con le condizioni ambientali. L'orologio biologico può essere anche regolato dalle differenze diurne di temperatura, come avviene ad esempio nel caso della sintesi delle putrescine e dell'adattamento delle piante a differenti temperature.

I geni che codificano per i componenti dell'apparato fotosintetici sono quelli maggiormente sincronizzati sull'orologio biologico. Ad esempio, l'mRNA della proteina ELIP (early light-induced protein) ha un picco alle 8:00 di mattina mentre quello della cisterna proteasi si accumula prevalentemente durante la notte. Tutte queste variazioni, che possono differire anche di due ordini di grandezza, sono probabilmente regolate dal fitocromo e avvengono a livello della trascrizione per mezzo di elementi *cis*-regolatori simili e vicini a quelli del controllo del fitocromo. Al contrario di altri organismi, nelle piante si conosce molto poco sulla struttura molecolare degli oscillatori circadiani e sulla loro connessione alla catena di trasduzione del segnale.

I fitoormoni

I fitoormoni sono sostanze a basso peso molecolare prodotte dalle piante. Agiscono come messaggeri a basse concentrazioni e si legano a specifici recettori, innescando una risposta, senza essere modificati chimicamente durante la loro azione. Oltre alle cinque ben note classi di fitoormoni (auxine, citochinine, gibberelline, acido abscissico ed etilene), ve ne sono altre di uguale importanza. I fitoormoni, inoltre, non si trovano allo stato libero all'interno della pianta, ma formano principalmente dei coniugati con zuccheri e gruppi amminici; quindi, la concentrazione di fitoormone attivo dipende non soltanto dal tasso di sintesi e di degradazione, ma anche dall'equilibrio tra forma libera e coniugata. Queste sostanze causano molti effetti che possono sovrapporsi tra le classi, ma i loro effetti sono molto specifici (ad esempio, le auxine aumentano l'allungamento dei coleptili delle graminacee ma non hanno nessun effetto sulla lunghezza degli internodi). I fitoormoni, infine, possono agire come antagonisti, cioè l'uno contro l'altro. A titolo d'esempio, infatti, il rapporto auxina/citochinina è importante per controllare l'organogenesi nelle colture tissutali e nei calli; il rapporto gibberelline/auxine può causare cambiamenti di sesso in fiori di alcune specie monoiche e dioiche; infine, il rapporto acido abscissico/gibberelline regola l'espressione genica dell' α -amilasi nelle cariossidi di alcune specie.

Oltre ai cinque gruppi di ormoni più conosciuti, ci sono altri quattro gruppi di regolatori della crescita: octadecanoidi (o jasmonati), oligosaccaridi, brassinosteroidi e peptidi ad azione ormonale. Essi sono stati caratterizzati biochimicamente, geneticamente e fisiologicamente come fitoormoni. Gli octadecanoidi, solitamente in forma di esteri metilici, sono ubiquitari nel regno vegetale e sono coinvolti negli stimoli esterni quali lo stress fisico e meccanico, la risposta ai patogeni e lo stress osmotico. In particolare, l'acido jasmonico è un importante messaggero implicato nella difesa della pianta nei confronti dei patogeni e nei fenomeni di tigmotropismo (tipico delle piante "rampicanti"). L'acido jasmonico è inoltre un composto volatile; questo è di fondamentale importanza per tutte le interazioni allelopatiche. Gli oligosaccaridi sono anch'essi messaggeri coinvolti nella difesa dai patogeni, sono regolatori della crescita e dello sviluppo ed hanno un'azione antagonista alle auxine. Sono prodotti dalle chitinasi e glucanasi della pianta che agiscono sui chito-oligosaccaridi della parete cellulare del fungo oppure dalle poligalatturonasi e dalla pectinasi del patogeno che agiscono sulla pectina della parete cellulare della pianta attaccata. I brassinosteroidi, isolati negli anni '70 dal genere *Brassica*, stimolano la crescita mediante l'aumento della divisione e l'espansione cellulare. Infine, i peptidi ad azione ormonale sono elementi essenziali nei meccanismi di trasduzione del segnale. Tra essi,

i più conosciuti sono la sistemina, di 18 amminoacidi, attivatore della biosintesi degli octadecanoidi, e l'ENOD₄₀, di 10-12 amminoacidi, che induce la formazione dei primordi dei noduli di *Rhizobium* stimolando la divisione cellulare e influenzando il bilancio citochinine/auxine.

Affinché un fitoormone causi una reazione, la cellula deve prima riconoscere l'ormone usando specifici recettori. I recettori si legano al fitoormone in modo specifico, reversibile e con un'alta affinità. Questo legame inizia una catena di trasduzione del segnale nella cellula che provoca reazioni fisiologiche. I recettori degli ormoni steroidei sono all'interno della cellula e quindi questi ormoni devono attraversare la membrana cellulare per raggiungere il recettore. La maggior parte degli ormoni sono però più idrofilici e i loro recettori sono sulla parte esterna del plasmalemma e il messaggio viene poi tradotto attraverso proteine G e una cascata di proteina-chinasi. Per identificare i recettori dei fitoormoni si possono utilizzare due strategie: una biochimica e una genetica. La prima utilizza i fitoormoni come una "trappola", in quanto l'ormone si lega ad alta affinità con il suo recettore: il fitoormone è legato alla matrice di una colonna cromatografia e quindi si può cercare la proteina che lega l'ormone mediante cromatografia ad affinità. La seconda tecnica, invece, usa la marcatura radioattiva per cercare la proteina: il fitoormone marcato è legato ad un gruppo fotoreattivo che è attivato dalla luce per produrre un legame covalente con la proteina attaccata ad esso.

I fitoormoni possono accendere o spegnere alcuni geni. Questo effetto è stato notato per la prima volta studiando la regolazione del metabolismo delle sostanze di riserva nelle cariossidi delle graminacee: dopo che la cariosside germina, le sostanze di riserva nell'endosperma e lo strato di aleurone sono mobilizzati da un segnale embrionale proveniente dalle gibberelline, che inducono la produzione di enzimi idrolitici dopo alcune ore mediante la sovra-regolazione della trascrizione dei rispettivi geni. L'azione dell'acido abscissico è invece diametralmente opposta. L'azione delle auxine sembra essere invece molto più veloce, determinando un aumento della trascrizione di molti geni già dopo 5-10 minuti. Alcuni dei geni indotti dall'auxina codificano per proteine nucleari con un'emivita breve e sono probabilmente fattori di trascrizione (con domini amminoacidici a foglietto- β seguiti due α -eliche consecutive) che a loro volta inducono la trascrizione di geni regolati sempre dall'auxina ma più tardivi. I promotori dei geni precoci regolati dall'auxina hanno due elementi *cis*-regolatori (AuxRDA e AuxRDB) necessari per l'induzione della trascrizione. Altri elementi *cis*-regolatori sono stati individuati anche nei promotori dei geni regolati dall'acido abscissico e della gibberelline ma il quadro completo dell'attivazione della trascrizione dei geni regolati da ormoni non è ancora lontano dall'essere definito con precisione.

I fitoormoni e la luce come regolatori dello sviluppo

Lo studio dello sviluppo del seme e delle piantine è fondamentale per esaminare le interazioni tra fattori esterni (principalmente luce e temperatura) a programmi di sviluppo endogeni. I fitoormoni, in particolare l'acido abscissico e le gibberelline, sono importanti regolatori di questi programmi. La maturazione del seme e la biogenesi dell'apparato fotosintetici nelle giovani piante necessitano di un'intensa sintesi proteica. I geni per queste proteine presentano un alto tasso di trascrizione e la loro trascrizione è finemente e strettamente regolata. Per questa ragione essi costituiscono dei sistemi-modello per lo studio della regolazione della trascrizione.

Lo sviluppo del seme nelle angiosperme

Il seme delle angiosperme è costituito dall'embrione, un endosperma più o meno sviluppato e il tegumento esterno (testa). Lo sviluppo del seme comincia da una doppia fertilizzazione: la cellula uovo si fonde con una delle due cellule spermatiche e si produce lo zigote, il quale si sviluppa successivamente in embrione; la seconda cellula spermatica si fonde con il nucleo diploide dell'endosperma e, dopo una serie di divisioni multiple, viene prodotto un endosperma multicellulare triploide. L'endosperma di molte piante diploidi è solo transitorio perché in seguito è degradato o assorbito dall'embrione, mentre nelle cariossidi delle Graminacee è persistente. Il processo che porta alla produzione di un seme dormiente può essere diviso in due fasi: nella prima si sviluppa un embrione multicellulare con radici, germoglio e cotiledoni; in seguito, la divisione cellulare si interrompe e la crescita del seme dipende solo dall'espansione cellulare. L'ultima fase dello sviluppo del seme nelle dicotiledoni può essere divisa in quattro stadi: maturazione, post-abscissione, pre-disidratazione e disidratazione. Questi stadi differiscono fisiologicamente e in termini di espressione genica. Durante la fase di maturazione, l'embrione raggiunge le massime dimensioni e la quantità di acqua nell'embrione diminuisce fino a raggiungere un plateau. La diminuzione di potenziale idrico è accompagnata da un aumento di acido abscissico. Successivamente, la quantità di acido abscissico diminuisce per poi aumentare nuovamente nella fase di post-abscissione. In *Arabidopsis*, il primo picco di acido abscissico è dovuto alla pianta madre mentre il secondo è attribuito allo stesso embrione. Durante la fase di maturazione, inoltre, si verifica una grande produzione di proteine e lipidi e, nelle Graminacee, di carboidrati nell'endosperma. Nel momento in cui la funzionalità del funicolo, che connette l'ovario con la pianta madre, si interrompe, la maturazione del seme è

completa e comincia la fase di post-abscissione, in cui la clorofilla viene degradata e il tegumento si scurisce e si indurisce. Gli mRNA per le proteine di riserva del seme scompaiono e quelli delle proteine LEA (*late embryogenesis abundant*) aumentano marcatamente. La maggior parte dei geni *LEA* codificano per proteine idrofiliche, alcune delle quali contengono sequenze caratteristiche quali ripetizioni in tandem di 11 aminoacidi che possono formare eliche antipatiche. Queste proteine proteggono probabilmente la cellula contro gli effetti della disidratazione. L'ultima fase di sviluppo del seme, quella della disidratazione, vede il seme geneticamente inattivo, con un metabolismo ridotto al minimo ed il tegumento completamente differenziato. L'embrione inizia così una fase di riposo, durante la quale può restare quiescente per lunghi periodi (dormienza) fino a che determinate condizioni permettono la germinazione.

Le molecole regolatrici degli stadi di sviluppo tardivi del seme

Il programma di sviluppo del seme consiste di moduli, ognuno dei quali ha un certo grado di autonomia ed è scandito da specifiche molecole regolatrici. Solo alcuni di questi segnali sono stati caratterizzati, come i fattori di trascrizione AB13 (*abscisic acid insensitive 3*) da *Arabidopsis* e il suo omologo nel mais VP1 (*viviparous 1*). I semi mutanti AB13 sono insensibili all'acido abscissico, non vanno incontro a dormienza e quindi germinano anche in presenza di esso sulla pianta madre (vivipari). Presenti nei semi solo durante l'ultima fase di sviluppo, AB13 e VP1 agiscono inoltre come regolatori che controllano l'espressione di alcuni (ma non di tutti) i geni *LEA* e *MAT* (questi ultimi sono geni che codificano per proteine di riserva del seme). È importante ricordare che questi fattori di trascrizione sono regolati dalla catena di trasduzione del segnale dell'acido abscissico. Sono stati identificati anche altri due geni, *fus3* e *lec1/2*, sono altri fattori di regolazione presenti nelle ultime fasi di sviluppo del seme e che sono stati identificati da studi condotti su *Arabidopsis*.

Il ruolo dell'acido abscissico

Durante lo sviluppo del seme, l'acido abscissico ha un ruolo fondamentale sia perché è un regolatore del programma di sviluppo endogeno e sia perché è un segnale della diminuzione del potenziale idrico durante la maturazione del seme. Se gli embrioni sono isolati dai semi nei primi stadi di sviluppo e incubati su un mezzo di coltura base, essi germinano prima del normale. Da ciò si deduce che le ultime fasi dello sviluppo embrionale non influiscono sulla capacità di germinazione dell'embrione stesso. Questa capacità germinativa è però inibita se è presente

acido abscissico. L'acido abscissico, e in particolare quello prodotto dall'embrione sembra quindi essenziale per indurre la dormienza *in planta*. Inoltre, se l'acido abscissico è aggiunto al mezzo di coltura, la sintesi degli mRNA dei geni *LEA*, tipicamente espressi nelle ultime fasi di maturazione del seme, aumenta più di quanto aumenterebbe in assenza di questo ormone. L'acido abscissico, quindi, non è necessario per l' "accensione" di questi geni, ma è necessario per la loro massima espressione. Concludendo, questo fitoormone è essenziale per indurre la dormienza e per regolare quantitativamente l'espressione dei geni *LEA*. Non è ancora noto invece se questi effetti sono dovuti solo all'acido abscissico o se sono indotti, in ultima analisi, dall'abbassamento del potenziale idrico o da altri fattori ancora.

La germinazione

L'emergenza della radichetta dal micropilo è spesso utilizzata per definire il punto di inizio della germinazione. La maggior parte dei semi delle piante selvatiche non sono capaci di germinare immediatamente dopo che sono stati rilasciati dalla pianta madre e quindi sono dormienti. Il vantaggio ecologico della dormienza dei semi è quello di superare lunghi periodi di condizioni non favorevoli senza andare incontro a malattie e deperimento, e di germinare quando le condizioni ritornano favorevoli. L'embrione germina quando i meccanismi (meccanici, fisiologici e biochimici) che bloccano questo processo sono stati rimossi, ma allo stesso tempo sono necessarie anche determinate condizioni ambientali (disponibilità di acqua e ossigeno, condizioni di temperatura e luce adatte). Per interrompere la dormienza, sono necessari specifici fattori ambientali. A volte, affinché la germinazione abbia successo, è necessario che il seme trascorra un periodo di freddo (vernalizzazione). A livello molecolare, questo fenomeno non è stato ancora spiegato.

Per molti semi, la luce è il fattore principale che interrompe la dormienza. Le piante che germinano alla luce sono definite *light germinators* e tendono ad avere piccoli semi con poche riserve, al contrario delle piante *dark germinators*, che hanno semi con molte riserve. La quantità di luce necessaria per la germinazione dipende dalla quantità di luce assorbita dalla pianta madre durante la formazione del seme. Esperimenti su *Arabidopsis* hanno mostrato inoltre che se le piante sono irraggiate con luce rossa mentre producono semi, molti degli stessi semi germineranno al buio rispetto alle piante cresciute sotto luce ricca di far-red. In presenza di gibberelline, i semi dei *light germinators* sono anche capaci di germinare al buio, ma non si conoscono ancora le cause.

Gli stadi di sviluppo precoci del seme

Poiché le risorse del seme sono limitate, la piantina emergente deve divenire autonoma il più presto possibile, le sostanze di riserva sono mobilizzate nei cotiledoni e viene assemblato l'apparato fotosintetico. Le proteine di riserva sono idrolizzate da endo- ed eso-peptidasi e i loro aminoacidi sono utilizzati per la sintesi *ex novo* di proteine e per la produzione di energia attraverso il ciclo di Krebs. I trigliceridi di riserva sono degradati in acidi grassi e glicerolo nei gliossisomi e poi vanno incontro a β -degradazione, con produzione di acetil-CoA e NADH. Infine, i carboidrati di riserva sono idrolizzati e trasformati per via fotosintetica in esosi nei plastidi. I geni che codificano per questi enzimi idrolitici sono per lo più sintetizzati *ex novo* durante la germinazione del seme e la loro trascrizione è generalmente finemente regolata.

Subito dopo, la piantina comincia a sviluppare il suo apparato fotosintetico e, di riflesso, quello del cloroplasto e della foglia. La biogenesi dei cloroplasti può essere divisa in più fasi: replicazione del DNA plastidiale e moltiplicazione di plastidi nella zona meristemica della foglia, aumento del numero di cloroplasti ed espansione cellulare, aumento significativo del tasso di trascrizione dei geni per la fotosintesi e sintesi dei tilacoidi e degli enzimi del ciclo di Calvin. La capacità di fissare CO₂ si manifesta più tardi, con l'accumulo della Subisco e della PEP carbossilasi nei cloroplasti, e l'efficienza fotosintetica raggiunge il suo massimo con l'aumento del numero dei complessi-antenna, in grado di assorbire ed incanalare i fotoni.

Lo studio della trasformazione degli ezioplasti in cloroplasti indotto dalla luce ha mostrato che le subunità delle proteine multimeriche nelle membrane tilacoidali (centri di reazioni dei fotosistemi I e II, complesso del citocromo *b₆/f* e ATP sintetasi), sono sintetizzati insieme in modo prestabilito: dopo la traduzione, le subunità di questi complessi sono immediatamente assemblati in unità funzionali per evitare la degradazione (infatti le subunità libere sono instabili). La clorofilla, ad esempio, è assolutamente necessaria per l'assemblaggio delle apoproteine del complesso della clorofilla-*a*. Questo spiegherebbe perché la mancanza di clorofilla nelle piante eziolate causa la mancata organizzazione del fotosistema I e II.

Una volta che le cellule raggiungono le massime dimensioni e l'apparato fotosintetico è pronto per produrre fotoassimilati, gli mRNA delle proteine coinvolte nella fotosintesi diminuiscono, ad eccezione di quelli che codificano per le proteine D1 e D2 del fotosistema II, le quali proteggono l'apparato fotosintetico dai radicali liberi e dalle specie attive dell'ossigeno (AOS) prodotti in condizioni di eccesso di potere riducente nella catena di trasporto di elettroni. A questo punto, l'apparato fotosintetico è completo, la piantina può crescere fotoautotroficamente.